

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büm

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

| | | | |
|--|--|---|---|
| (51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : G01N 33/53, C12Q 1/37, 1/68 | | A1 | (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/34210 |
| | | | (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 8. Juli 1999 (08.07.99) |
| (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/08314 (22) Internationales Anmeldedatum: 18. Dezember 1998 (18.12.98) (30) Prioritätsdaten: 197 57 571.4 23. Dezember 1997 (23.12.97) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: OSSWALD, Hartmut [DE/DE]; Am Apfelberg 10, D-72076 Tübingen (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KLOOR, Doris [DE/DE]; Stuttgarter Strasse 94, D-71032 Böblingen (DE). (74) Anwalt: TESCH, Rudolf; 10, rue du Général Freytag, F-67390 Marckolsheim (FR). | | (81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, IL, JP, NO, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen. | |
| (54) Title: ADENOSINE DETECTION IN SMALL SAMPLES (54) Bezeichnung: NACHWEIS VON ADENOSIN IN KLEINEN PROBEN (57) Abstract <p>The invention relates to a method for detecting adenosine with the inactive S adenylyl homocystine hydrolase enzyme which selectively and only binds adenosine with a high affinity. The inventive method enables adenosine to be determined in small sample volumes without the need for additional purification of said sample.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung betrifft ein Nachweisverfahren von Adenosin mit dem inaktiven Enzym S-Adenosylhomocystein Hydrolase, das nur noch Adenosin mit hoher Affinität selektiv bindet. Dadurch ist es möglich, Adenosin in kleinen Probenvolumina ohne zusätzliche Aufreinigung der Probe zu bestimmen.</p> | | | |

03/00 864
210

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

| | | | | | | | |
|----|------------------------------|----|-----------------------------------|----|---|----|--------------------------------|
| AL | Albanien | ES | Spanien | LS | Lesotho | SI | Slowenien |
| AM | Armenien | FI | Finnland | LT | Litauen | SK | Slowakei |
| AT | Österreich | FR | Frankreich | LU | Luxemburg | SN | Senegal |
| AU | Australien | GA | Gabun | LV | Lettland | SZ | Swasiland |
| AZ | Aserbaidschan | GB | Vereinigtes Königreich | MC | Monaco | TD | Tschad |
| BA | Bosnien-Herzegowina | GE | Georgien | MD | Republik Moldau | TG | Togo |
| BB | Barbados | GH | Ghana | MG | Madagaskar | TJ | Tadschikistan |
| BE | Belgien | GN | Guinea | MK | Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien | TM | Turkmenistan |
| BF | Burkina Faso | GR | Griechenland | ML | Mali | TR | Türkei |
| BG | Bulgarien | HU | Ungarn | MN | Mongolei | TT | Trinidad und Tobago |
| BJ | Benin | IE | Irland | MR | Mauretanien | UA | Ukraine |
| BR | Brasilien | IL | Israel | MW | Malawi | UG | Uganda |
| BY | Belarus | IS | Island | MX | Mexiko | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| CA | Kanada | IT | Italien | NE | Niger | UZ | Usbekistan |
| CF | Zentralafrikanische Republik | JP | Japan | NL | Niederlande | VN | Vietnam |
| CG | Kongo | KE | Kenia | NO | Norwegen | YU | Jugoslawien |
| CH | Schweiz | KG | Kirgisistan | NZ | Neuseeland | ZW | Zimbabwe |
| CI | Côte d'Ivoire | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | PL | Polen | | |
| CM | Kamerun | KR | Republik Korea | PT | Portugal | | |
| CN | China | KZ | Kasachstan | RO | Rumänien | | |
| CU | Kuba | LC | St. Lucia | RU | Russische Föderation | | |
| CZ | Tschechische Republik | LI | Liechtenstein | SD | Sudan | | |
| DE | Deutschland | LK | Sri Lanka | SE | Schweden | | |
| DK | Dänemark | LR | Liberia | SG | Singapur | | |
| EE | Estland | | | | | | |

Nachweis von Adenosin in kleinen Proben

- Die Erfindung betrifft ein Nachweisverfahren zum Messen von Adenosin in kleinen Proben bei welchem zu einer auf Adenosin zu untersuchenden Flüssigkeit reduzierte S-Adenosyl-
- 5 homocystein-Hydrolase sowie markiertes Adenosin, jeweils in definierten Mengen, zugegeben wird, danach der S-Adenosyl-homocystein-Hydrolase-Adenosin-Komplex, vorzugsweise mit einer Filtrationsapparatur abgetrennt wird und anschließend die in diesem Komplex vorhandene Markierung gemessen wird.
- 10 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Zusammenstellung der für den Test erforderlichen Analyse-Substanzen.
- Adenosin ist ein endogenes Nukleosid, das als allgemein regulatorische Substanz zusammen mit anderen Hormonen und
- 15 Neurotransmittern in physiologische Prozesse eingreift. Die Wirkungen von Adenosin werden über Rezeptoren an der Zelloberfläche vermittelt, die ubiquitär in Säugetieren zu finden sind.
- Adenosin entsteht in der Zelle zum einen aus dem Abbau von
- 20 AMP durch endo- und ekto-5'-Nucleotidasen, zum anderen durch die Hydrolyse von S-Adenosylhomocystein (SAH) zu Adenosin und Homocystein durch die SAH-Hydrolase. Als Abbauprodukt der energiereichen Phosphate hat Adenosin allgemein die Funktion des Mediators der metabolischen Kontrolle der
- 25 Organfunktion in Herz, Niere und ZNS. In der biomedizinischen Forschung (Biochemie, Pharmakologie, Physiologie, klinische Chemie) nimmt das Interesse des Nachweises von endogenem Adenosin u.a. deswegen zu, weil in der letzten Zeit Adenosin-Rezeptor antagonisierende
- 30 Substanzen als Arzneimittel in die Therapie eingeführt werden. Im Rahmen dieses gestiegenen Interesses am Adenosin nimmt auch die Forschung in den Laboratorien als auch in den Universitätskliniken weltweit zu um zu belegen, daß unter verschiedenen Funktionszuständen die Adenosinkonzentrationen
- 35 in den Körperflüssigkeiten geändert werden.

Zur Messung von Adenosin stehen gegenwärtig mehrere Methoden zur Verfügung:

1. Spektralphotometer

Am Photometer wird der Abbau von Adenosin durch die Adenosindesaminase bei einer Wellenlänge von 265 nm gemessen. Der Nachteil dieser Meßmethode besteht darin, daß die zu messende Probe frei sein muß von interferierenden Substanzen, was zu einer zusätzlichen Aufreinigung der Probe führt. Außerdem liegt die Nachweisgrenze für Adenosin im Photometer bei 10^{-7} M.

2. Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Auch die HPLC detektiert das Adenosin bei einer Wellenlänge von 265 nm. Eine Interferenz mit anderen Substanzen, bei dieser Wellenlänge, kann durch die geeignete Wahl des Fließmittels umgangen werden. Ein Nachteil dieser Methode ist die zusätzliche Aufreinigung der Proben. Hinzu kommt die geringe Sensitivität der HPLC, die ähnlich der des Photometers ($3 \cdot 10^{-7}$ M) ist.

3. Radioimmunoassay

Der RIA beruht auf einer Antikörper Methode mit Adenosin 2',3'-O-Disuccinyl-3-[125 I]-Iodtyrosin Methyl Ester als Tracer und einem Antikörper gegen Disuccinyliertes-Adenosin. Ein Vorteil dieser Methode liegt darin, daß eine Aufreinigung der Proben entfällt, nachteilig ist die Succinylierung jeder Probe vor der Messung. Die Nachweisgrenze dieses Tests liegt bei $6 \cdot 10^{-9}$ M. Damit ist der RIA zum Nachweis von Adenosin empfindlicher als HPLC und Photometer. Ein weiterer Nachteil dieses Testes ist, daß er nur in Japan erhältlich und mit 1600.- DM für 40 Proben einschließlich Eichkurve recht teuer ist.

Aufgabe der Erfindung war es daher, ein Nachweisverfahren zu schaffen, das es ermöglicht, auch in kleinsten Proben von

z.B. 10 μ l, oder in Biopsien von 2-10 mg Gewebe, Adenosin messen zu können, das keine aufwendige Aufreinigung der Probe erfordert und sehr sensitiv ist.

5 Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß ein Nachweisverfahren zum Messen von Adenosin in kleinen Proben zur Verfügung gestellt wird, bei welchem zu einer auf Adenosin zu untersuchenden Flüssigkeit reduzierte S-Adenosylhomocystein-Hydrolase sowie markiertes Adenosin, jeweils in definierten Mengen, zugegeben wird, danach der S-Adenosylhomocystein-Hydrolase-Adenosin-Komplex, vorzugsweise
10 mit einer Filtrationsapparatur abgetrennt wird und anschließend die in diesem Komplex vorhandene Markierung gemessen wird.

Dieses Nachweisverfahren beruht auf der Fähigkeit des Enzyms
15 SAH-Hydrolase (reduzierte Form des Enzyms) Adenosin zu binden.

In der nachfolgenden Tabelle 1 sind die Werte aufgeführt die belegen, daß das reduzierte Enzym Adenosin bindet nicht aber die Substanzen die an das nicht reduzierte Enzym binden.

Tabelle 1

Verdrängung des 3H-Adenosins von der reduzierten und nicht reduzierten Form der SAH-Hydrolase durch Adenosin und Adenosin Analoga. Angegeben sind die EC_{50} -Werte in nmol/l.

| | | | |
|----|-----------------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| 5 | Adenosin Analoga | nicht-reduzierte SAH-Hydrolase | reduzierte SAH-Hydrolase |
| 10 | Adenosin | 57 | 24 |
| | cAMP | 104 | > 100000 |
| | Adenin | 11500 | > 100000 |
| 15 | 2'Desoxyadenosin | 94 | 630 |
| | SAH | 246 | 400 |
| 20 | Homocystein | 5000 | 5000 |
| | AMP | 10000 | 100000 |
| | ADP | 10000 | > 100000 |
| 25 | AMP | 10000 | > 100000 |
| | Inosin | 10000 | 10000 |
| 30 | Diadenosin-Diphosphat | 138 | 10000 |
| | Diadenosin-Dialdehyd | 180 | 10000 |
| | NECA | 240 | > 100000 |
| 35 | Theophyllin | > 100000 | > 100000 |

Die Vorteile dieses neuen Nachweisverfahrens bestehen darin, daß dieses enzymatisch inaktive Enzym weiterhin seine Fähigkeit Adenosin mit hoher Aktivität (K_d 20 nM) zu binden behält. Da dieses Enzym keine Interferenzen mit endogen vorkommenden Substanzen zeigt, entfällt eine weitere Aufreinigung der zu untersuchenden Proben.

Im folgenden soll die Erfindung an Hand eines möglichen Ausführungsbeispiels näher erläutert werden:

Gereinigt wird die SAH-Hydrolase aus Organen z.B. aus Rindernieren bis zur Homogenität.

Das Enzym wird mit klassischen chromatographischen Methoden gereinigt.

- 5 Die Rinderniere (600 g) wird mit 50 mM Kaliumphosphat Puffer pH 7.0, 1 mM DTT; 1 mM EDTA, im Verhältnis 1 Teil Niere, 2 Teile Puffer homogenisiert und anschließend für 45 Minuten bei 20000 x g und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wird mit einer 50% Ammoniumsulfatfällung (164 g/l) gefällt und
10 durch Zentrifugation 30 Minuten bei 20000 x g wird das Präzipitat abgetrennt. Das Präzipitat wird in 300-400 ml 20 mM Tris/HCl Puffer pH 7.4, 1 mM DTT, 1 mM EDTA gelöst und über Nacht gegen den gleichen Puffer dialysiert.

Säulenchromatographie

- 15 1. DEAE-Säule.

- Die dialysierte Proteinlösung wird auf eine DEAE-Säule (25 x 5 cm) aufgetragen die gegen den 20 mM Tris/HCl Puffer pH 7.4, 1 mM DTT und 1 mM EDTA äquilibriert wurde. Nach Spülen der Säule mit weiteren 1000 ml des gleichen Puffers wird das
20 Enzym entlang eines linearen Gradienten - 1000 ml Startpuffer und 1000 ml 500 mM KCl in oben genanntem Puffer - eluiert. Die SAH-Hydrolase eluiert bei einer Konzentration von 250-350 mM KCl (Laufgeschwindigkeit 10 ml/min). Die enzymatisch aktiven Fraktionen aus der
25 Ionenaustauschchromatographie werden vereinigt (ca. 350 ml) und gegen Kaliumphosphatpuffer 10 mM pH 7.0 dialysiert.

2. Hydroxylapatit-Säulenchromatographie

- Die dialysierte Enzymlösung wird anschließend über eine Hydroxylapatit Bio-Gel HTP Säule (10 x 5 cm) gegeben, welche
30 vorher mit 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.0 äquilibriert wurde. Unter diesen Bedingungen wird die SAH-Hydrolase nicht an das Säulenmaterial gebunden, sondern erscheint in den Durchbruch-Fractionen (Laufgeschwindigkeit 1.5 ml/min).

3. Aminoethyl Sepharose Chromatographie

- 35 Die enzymatisch aktiven Fraktionen werden vereinigt und auf eine 10 EAH-Sepharose 4B Säule 10 x 2.6) aufgetragen.

Äquibriert wird die Säule mit 10 mM Kaliumphosphatpuffer. Diese Säule dient neben der Aufreinigung der Aufkonzentrierung der Fraktionen von der Hydroxylapatit Säule. Das Enzym wird mit einem linearen 500 mM KCl Salzgradienten in 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.0 eluiert. Die enzymatisch aktiven Fraktionen, die bei einer Konzentration von 120 - 200 mM KCl eluierten, werden vereinigt und mit Hilfe eines Proteinkonzentrators (Ausschlußmolekulargewicht der Membran 30000 Dalton) auf 3 ml aufkonzentriert.

4. Superdex TM Gelfiltrations Chromatographie

Die konzentrierte Enzymlösung wird abschließend auf eine Hi Load TM 26/60 Superdex TM Säule (60 x 2.6 cm) aufgegeben, die mit PBS pH 7.4, 1 mM DTT und 1 mM EDTA äquibriert wurde. Die Chromatographie wird mit dem gleichen Puffer bei einer Laufgeschwindigkeit von 0.2 ml/min durchgeführt. Die enzymatisch aktiven Fraktionen werden vereinigt und der Proteingehalt bestimmt.

Die Reinheit des isolierten Enzyms wird mit der SDS-Polyacrylamidgradientengel Elektrophorese überprüft. Aus einer 600 g schweren Nieren werden 30 mg SAH-Hydrolase erhalten. Dieses Enzym wird durch Austausch des NAD^+ mit NADH inaktiviert.

Die Inaktivierung des Enzyms kann mit drei unterschiedlichen Methoden durchgeführt werden:

1. Das enzymatisch aktive Enzym wird mit 150 mM NaCl, 8mM ATP und 8 mM MgCl_2 für 90 Minuten bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit löst sich das fest gebundene NAD^+ vom Enzym, das durch anschließende Dialyse entfernt wird. Es entsteht ein apo-Enzym ohne Enzymaktivität und ohne Adenosin-Bindungskapazität. mit einer 1 mM NADH Lösung wird das apo-Enzym für weitere 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird das nicht gebundene NADH durch Dialyse entfernt und es resultiert ein enzymatisch inaktives Enzym mit hoher Adenosin-Bindungskapazität.

2. Das enzymatisch aktive Enzym wird in einem Verhältnis 1:2 mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung 60 Minuten bei Raumtemperatur oder 0°C inkubiert. Nach 30 minütiger Zentrifugation bei 12000 x g wird das Pellet in 15 mM Tris/Hepes Puffer pH 7.0 gelöst und gegen den gleichen Puffer 6 Stunden mit 2 x Pufferwechsel dialysiert. Danach wird das apo-Enzym mit 1 mM NADH für 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das nicht gebundene NADH wird durch Dialyse entfernt. Die NADH-SAH-Hydrolase ist enzymatisch inaktiv, besitzt aber Adenosin Bindungskapazität.
3. Enzymatisch aktive SAH-Hydrolase wird mit 100 µM Azido-Adenosin für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird das Enzym-Azido-Adenosin-Gemisch 5 Minuten mit kurzwelligem UV-Licht (254 nm) bestrahlt. Dadurch bindet das Azido-Adenosin kovalent an die SAH-Hydrolase was zu einer enzymatischen Inaktivierung des Enzyms führt. Das überschüssige Azido-Adenosin wird durch Dialyse entfernt. Diese reduzierte SAH-Hydrolase ist enzymatisch inaktiv, bindet jedoch Adenosin mit hoher Kapazität. Bei der Reduktion der SAH-Hydrolase, unabhängig von der angewandten Methode, kommt es zu einem Verlust an Protein von 25% (entspricht 7.5 mg). Das inaktive Enzym (2 mg/ml) ist bei 4°C in Pufferlösung (20 mM Tris/Hepes pH 7.0) bis zu 4 Wochen stabil. Bei -20°C über 2 Monate. In lyophilisiertem Zustand (2 mg/ml) und bei -20°C ist dieses Enzym über 4 Monate lang stabil. Aus einer Rinderniere läßt sich soviel Bindungsprotein herstellen, daß etwa 20000 Proben auf ihre Adenosinkonzentration gemessen werden können.
- Nachweis von Adenosin durch Hemmungsexperiment:
Nachgewiesen wird das Adenosin mit Hilfe eines sogenannten Hemmungsexperiments. Dabei konkurriert das Adenosin aus der zu messenden Probe mit dem radioaktiv markierten Adenosin um die Bindungsstelle am reduzierten SAH-Hydrolase Molekül.
- Zum Nachweis der Adenosin Konzentration werden pro Versuchsansatz, der ein Endvolumen von 300 µl enthält,

folgende Einzelkomponenten zugegeben:

- 100 μ l reduzierte SAH-Hydrolase (1 μ g/300 μ l)
- 50 μ l ^3H -Adenosin (1 pmol/300 μ l) - Spezifische Aktivität 62 Ci/mmol
- 5 100 μ l Probe
- 50 μ l Puffer - 20 mM Tris, 40 mM Hepes Puffer pH 7.4

Da die Assoziation von Adenosin an das reduzierte Enzym bei Raumtemperatur 10 Stunden dauert, werden die Proben über Nacht inkubiert. Das an das reduzierte Enzym gebundene radioaktiv markierte Adenosin wird von dem nicht gebundenen Adenosin über einen Nitrocellulosefilter mit einer Filtrationsapparatur getrennt. Dabei bleibt der Adenosin-Enzym-Komplex auf dem Filter hängen und die gebundene Radioaktivität wird mit einem Szintillationscounter gemessen

15 Damit das Adenosin aus der Probe ausgewertet werden kann, wird eine Eichkurve mit bekannten Adenosinkonzentrationen hergestellt. Eingesetzt werden Adenosin-Konzentrationen von 1 - 100 nM. Wenn nun der Logarithmus der eingesetzten Adenosin-Konzentrationen gegen die spezifische Bindung von ^3H -Adenosin aufgetragen wird ergibt sich klassischerweise eine sigmoidale Dosis-Wirkungskurve. Der Anstieg dieser Kurve ergibt die Eichgerade. Anhand dieser Kurve läßt sich nun die unbekannte Adenosin-Konzentration in der Probe bestimmen.

25 Da die Affinität von Adenosin an das inaktive Enzym hoch ist und erfindungsgemäß ^3H -Adenosin als Tracer benutzt wird, liegt die Nachweisgrenze für Adenosin in diesem Assay bei 10^{-10} M oder 10 fmole/Probe.

Dieses Nachweisverfahren kann für Forschungszwecke eingesetzt werden, wenn nur kleine Probenmengen zur Verfügung stehen und die Sensitivität der HPLC- oder anderen Methoden nicht ausreicht. Weitere Anwendungen des Radio-Enzym-Testes sind Kontrastmitteluntersuchungen und Nierentransplantationen als prognostische Aussage für die Nierenfunktion.

Die erfindungsgemäße Zusammenstellung von Analyse-Substanzen zur Bestimmung von Adenosin in kleinen Proben wird gemäß nachfolgendem Beispiel beschrieben.

Test-Kit zur Bestimmung von Adenosin enthaltend:

- 5 [2,8,5'-³H]-Adenosin 110 pmol (lyophilisiert)
- Reduzierte SAH-Hydrolase 110 µg (lyophilisiert)
- Adenosin 16.5 mg (pulv.)
- Aktivkohle 2 g (pulv.)
- Dextran 1 g (pulv.)
- 10 20 mM Tris/HCl Puffer pH 7.0 100 ml Konzentrat 2x (liquid.)

Zum erfindungsgemäßen Nachweis von Adenosin werden [2,8,5'-³H]-Adenosin und die reduzierte SAH-Hydrolase mit 20mM Tris/HCl Puffer pH 7.0 rekonstituiert. Aus den 16.5 mg Adenosin wird eine 6 mM Adenosin-Lösung hergestellt und
15 entsprechend verdünnt, um eine Eichgerade mit Endkonzentrationen im Testansatz von 10, 25, 50, 75, 100, 150 und 200 nM zu haben.

Aktivkohle und Dextran werden dazu benötigt, um eine 0.6% Aktivkohle und 0.2% Dextran enthaltende Lösung in 20 mM
20 Tris/HCl pH 7.0 herzustellen.

Der Enzym-Ligand-Komplex muß mittels Filtration getrennt werden.

Durch Zugabe von 1 ml der Aktivkohle/Dextranlösung zum Testansatz und anschließende Zentrifugation kann der Enzym-
25 Ligand-Komplex ebenfalls abgetrennt werden.

Zur analytischen Bestimmung werden jeweils 100 µl [2,8,5'-³H]-Adenosin, 100 µl SAH-Hydrolase und 100 µl Probe bzw. kaltes Adenosin für die Eichgerade eingesetzt.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von Adenosin in Flüssigkeiten, dadurch gekennzeichnet, daß zu einer auf Adenosin zu untersuchenden Flüssigkeit reduzierte S-Adenosylhomocystein-Hydrolase sowie markiertes Adenosin, jeweils in definierten Mengen, zugegeben wird, danach der S-Adenosylhomocystein-Hydrolase-Adenosin-Komplex, vorzugsweise mit einer Filtrationsapparatur abgetrennt wird und anschließend die in diesem Komplex vorhandene Markierung gemessen wird.
2. Verfahren zum Nachweis von Adenosin in Flüssigkeiten nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Markierung eine radioaktive oder Fluoreszenzmarkierung ist.
3. Verfahren zum Nachweis von Adenosin in Flüssigkeiten nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß eine Probenvorbereitung und Aufreinigung, um störende andere Substanzen wie sie normalerweise in Körperflüssigkeiten gefunden werden, nicht mehr nötig ist.
4. Verfahren zum Nachweis von Adenosin in Flüssigkeiten nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß Adenosin bei Kontrastmitteluntersuchungen gemessen wird.
5. Verfahren zum Nachweis von Adenosin in Flüssigkeiten nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß Adenosin zur Bestimmung des Funktionszustandes isolierter Organe gemessen wird.
6. Zusammenstellung von Analyse-Substanzen zur Bestimmung von Adenosin in Flüssigkeiten, enthaltend [2,8,5-³H]-Adenosin, reduzierte SAH Hydrolase, Adenosin, Aktivkohle und Dextran.
7. Zusammenstellung von Analyse-Substanzen zur Bestimmung von Adenosin in Flüssigkeiten gemäß Anspruch 6, enthaltend 110 pm [2,8,5-³H]-Adenosin, 110 µg SAH Hydrolase, 16.5 mg Adenosin, 2 g Aktivkohle, 1 g Dextran und 100 ml (2x Konzentrat) 20 mM Tris/HCl pH 7.0.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat'l Application No

PCT/EP 98/08314

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 G01N33/53 C12Q1/37 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 G01N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| X,P | <p>BIOLOGICAL ABSTRACTS, Philadelphia PA USA; abstract no. PREV199800291792, see abstract XP002103818 & D. KLOOR ET AL.: "A simple and sensitive assay for the measurement of adenosine in small samples." DRUG DEVELOPMENT RESEARCH, vol. 43, no. 1, 1 January 1998, page 33 New York NY USA</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p> | 1-7 |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 May 1999

Date of mailing of the international search report

07/06/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Van Bohemen, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern: 1st Application No

PCT/EP 98/08314

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| X | CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 125, no. 19, 4 November 1996 Columbus, Ohio, US; abstract no. 241657, XP002103819 see abstract | 6 |
| A | & D. KLOOR ET AL.: "S-adenosylhomocysteine-hydrolase from bovine kidney. Enzymatic and binding properties" KIDNEY BLOOD PRESSURE RESEARCH, vol. 19, no. 2, 1996, pages 100-108, New York NY USA ----- | 1-5,7 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/08314

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 G01N33/53 C12Q1/37 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 G01N C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung; soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch.Nr. |
|------------|--|--------------------|
| X, P | BIOLOGICAL ABSTRACTS, Philadelphia PA USA; abstract no. PREV199800291792, siehe Zusammenfassung XP002103818 & D. KLOOR ET AL.: "A simple and sensitive assay for the measurement of adenosine in small samples." DRUG DEVELOPMENT RESEARCH, Bd. 43, Nr. 1, 1. Januar 1998, Seite 33 New York NY USA --- -/-- | 1-7 |

| | | | |
|--|--|---|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen | | <input type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie | |
| <p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> | | <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> | |
| Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 26. Mai 1999 | | Absenddatum des internationalen Recherchenberichts 07/06/1999 | |
| Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 | | Bevollmächtigter Bediensteter Van Bohemen, C | |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern 1ales Aktenzeichen

PCT/EP 98/08314

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| X | CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 125, no. 19, 4. November 1996 Columbus, Ohio, US; abstract no. 241657, XP002103819 siehe Zusammenfassung | 6 |
| A | & D. KLOOR ET AL.: "S-adenosylhomocysteine-hydrolase from bovine kidney. Enzymatic and binding properties" KIDNEY BLOOD PRESSURE RESEARCH, Bd. 19, Nr. 2, 1996, Seiten 100-108, New York NY USA ----- | 1-5,7 |